

**Über die Bedeutung der Aktivitätsbestimmung
der Aepfelsäuredehydrogenase und der
Fruktose-1-Phosphat-Aldolase im Serum**

von
Werner Diegel
aus Bamberg



Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning)

Über die Bedeutung der Aktivitätsbestimmung der Aepfelsäure-
dehydrogenase und der Fruktose-1-Phosphat-Aldolase im Serum.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Werner Dietzel
aus Bamberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg.

Dekan: Prof. Dr. G. H e g e m a n n

Referent: Prof. Dr. N. H e n n i n g

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 7. 1962

Eine Fülle von Arbeiten über das Verhalten von Enzymaktivitäten in Körperflüssigkeiten und Organen ist in den letzten Jahren erschienen. Dabei sind bei verschiedenen Krankheitsbildern eine Reihe von Fermentaktivitätsänderungen im Serum beschrieben worden. Für die praktische klinische Diagnostik stellt sich deshalb die Frage, mit welcher Kombination von Enzymen bei den verschiedenen Erkrankungen der größte Erkenntnisgewinn zu erhalten ist.

Bei unseren systematischen Untersuchungen dieser Fragestellung sollten in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Aepfelsäuredehydrogenase (AeDH) und der Fruktose-1-Phosphat-Aldolase (F₁P-Aldolase) geprüft werden, ob Aktivitätsänderungen dieser beiden Fermente im Serum im Vergleich zu den früher untersuchten Enzymen (GPT, GOT, MDH, SDH) für die klinische Diagnostik von Bedeutung sind. Während über die F₁P-Aldolase bereits einige Untersuchungen vorliegen (2,4,5,7,8,10,11,12), existiert über die AeDH neben ausländischen Arbeiten (1,6), im deutschen Schrifttum nur eine Arbeit von H e s s (3).

Methodik

A. AeDH - Aktivität:

Die Messung im optischen Test, der Ablauf der Reaktion Aepfelsäure $\longleftrightarrow$ Oxalessigsäure, bei dem DPN-H verbraucht wird, wurde mit Hilfe des Photometers "Eppendorf" bei 366 m μ verfolgt. Die Aktivität des Ferments ist der Änderung der Lichtabsorption pro Zeiteinheit proportional.

Notwendige Reagentien:

1. Phosphatpuffer pH 7,5. 0,066 - 0,1 m.
2. DPN-H, Dinatriumsalz. 100 mg in 10 ccm aq.bidest. lösen.
3. Oxalessigsäure, 7 x 10⁻³ m als Na-Salz mit aq.bidest. auflösen.
(frisch bereiten!)

Ausführung

Man pipettiert in eine 10 mm - Cuvette:

2,65 ml Phosphatpuffer

0,05 ml DPN-H

0,20 ml Serum

Dieses Gemisch wird 10 min lang bei 25° vorinkubiert. Dabei reagiert die Brenztraubensäure des Serums mit der serumeigenen MDH unter DPN-H - Verbrauch ab. Danach gibt man 0,1 ml Oxalessigsäure hinzu und liest nach 2 bis 3 min die Extinktion über 6 bis 10 min im 2-Minutenabstand ab. Bei hoher AeDH-Aktivität im Serum wurde alle 60 sec abgelesen, dabei mußte bei schnellem Substrat- und DPN-H - Verbrauch OES und DPN-H nachgegeben, oder das Serum verdünnt werden.

Berechnung der Aktivität

Sie erfolgt nach der von B ü c h e r definierten Enzymeinheit. Eine Büchereinheit ändert in 100 sec bei 25° die DPN-H - Extinktion bei 366 mμ um 0,100, bezogen auf 1 ml Serum und gemessen in 10 mm - Cuvetten. Pro Bücher-Einheit wird 0,030 Mikromol/ml oder 20,1 μg/ml DPN-H umgesetzt. Dabei ergibt sich bei einem Ansatz von 3,0 ml mit 0,2 ml Serum bei der Extinktionsänderung pro 60 sec eine Berechnung von:

$$\frac{E_{366}}{0,100} \times \frac{100}{60} \times \frac{3,0}{0,2} = E_{366} \times 250 \text{ Einheiten/ml Serum}$$

Für die Berechnung nach Internationalen Einheiten gilt:

1 IE = Substratumsatz in μmol/min/1000 ml Serum bei 25°.

1 IE = 55 Bücher-Einheiten

Daraus ergibt sich für die Berechnung nach IE:

$$E_{366} \times 4,55.$$

B. F_1P - Aldolase - Aktivität

Messung im gekoppelten optischen Test mit α -Glycerophosphatdehydrase (B a r a n o w s k i - Ferment) als Hilfsenzym.

Baranowski-Ferment führt Phosphodioxyaceton in α -Glycerophosphat über, wobei DPN-H zu DPN reduziert wird. Die Abnahme der Extinktion bei 366 m μ ist der Spaltungsgeschwindigkeit von Fruktose-1-Phosphat direkt proportional und läßt sich im Photometer verfolgen.

Bestimmungsansatz:

Reagentien:

DPN-H "Boehringer", Dinatriumsalz, 100 mg werden in 10 ccm aq.bidest. gelöst.

α -Glycerophosphatdehydrase "Boehringer", Kristallsuspension.

Fruktose-1-Phosphat - Bariumsalz "Boehringer".

0,9 F_1P -Salz werden in 4,0 ml aq.bidest. gelöst und mit 465 mg Na_2SO_4 unter Beigabe von 0,2 ml 1 n- H_2SO_4 in Natriumsalz umgewandelt. Das entstehende Bariumsulfat wird abzentrifugiert und die überstehende klare Lösung des Na-Salzes des F_1P mit aq.bidest. auf 5 ml aufgefüllt. Das pH wird mit 0,1 n-NaOH auf 7,6 eingestellt. Aufbewahren in der Kälte.

Als Puffer verwendeten wir einen 0,1 m-Phosphatpuffer (pH 7,6).

Wir setzten zuerst 2,0 ml Serum mit 0,05 ml DPN-H an, ließen 15 min vorinkubieren und gaben 0,02 ml der α -GDH-Suspension und 0,2 ml der F_1P -Lösung zu. Gemessen wurde im temperierbaren Cuvettenhalter bei 36°. Wir konnten darauf im Photometer eine so große Aktivität der F_1P -Aldolase feststellen, daß wir uns entschlossen, mit der Serummenge auf 0,2 ml zurückzugehen und bei 25° zu messen.

Unser modifizierter Versuchsansatz besteht nun in:

2,53 ml 0,1 m - Phosphatpuffer, pH 7,6

0,2 ml Serum

0,05 ml DPN-H

Dieses Gemisch wird bei 25° 15 min lang vorinkubiert, anschließend werden 0,02 ml α -GDH und 0,2 ml F₁P-Lösung zugegeben, so daß der Testansatz 3 ml beträgt. Ablesung wie oben.

Wir legten die Aktivität der F₁P-Aldolase, wie die der AeDH nach IE fest, die leicht zu berechnen sind, indem man die lineare, durchschnittliche, minütliche Extinktionsänderung mit 4,55 multipliziert.

Ergebnisse der Untersuchungen

A. AeDH

Wir untersuchten das Serum von 203 Patienten auf die AeDH-Aktivität. Insgesamt wurden 242 Bestimmungen, z.T. unter gleichzeitiger Bestimmung der Transaminasen (GPT und GOT) und der MDH ausgeführt. Normalwerte (siehe Abb.1) wurden in den Seren von 40 Blutspendern gemessen. Diese Personen waren apparent gesund und wiesen vor allem keinerlei Leberaffektionen auf. Die Werte, die sich dabei ergaben, liegen in einem Bereich zwischen 30 und 80 Einheiten. Der Mittelwert beträgt 56,2 Einheiten. Auf Grund des 2 σ -Bereiches ergibt sich als Abgrenzung von sicher pathologischen Werten ($\sigma = 11,6$)

56,2 $\pm$ 23,2 Einheiten.

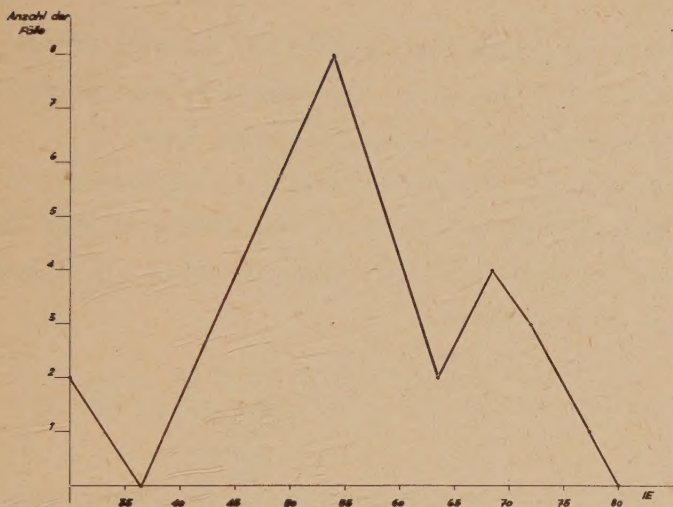


Abb. 1: Verteilung der AeDH-Normalwerte

Klinische Resultate

Hepatitis epidemica acuta

Wir untersuchten 122 Seren Hepatitiskranker auf die Aktivität von AeDH und GPT mit dem Ziel der Abgrenzung eines krankheits-spezifischen Enzymmusters.

Dabei waren in 71 Fällen sowohl die AeDH als auch die GPT erhöht. Während die GPT-Aktivität 110 mal über ihren Normalwert hinaus vermehrt war, sahen wir bei der AeDH 83 Vermehrungen der Aktivität (siehe Tab.1).

	normal	erhöht in %	
		50 - 300	über 300
GPT	10,6	35,2	39,6
AeDH	32,8	29,6	2,4

Tab. 1: Verteilung der Fermentaktivitäten bei akuter Hepatitis

Lediglich in 12 Fällen lag die AeDH bei normalen GPT-Werten zwischen 75 - 100 Einheiten, einem Bereich, dem man noch keine krankheitsspezifischen Aussagen entnehmen kann.

Die höchsten Aktivitätswerte fanden wir zu Beginn der Hepatitis. In Einzelfällen wurden Werte über 1000 Einheiten gemessen, während in der Regel die Aktivität nicht über 400 Einheiten hinausging (siehe Abb.2).

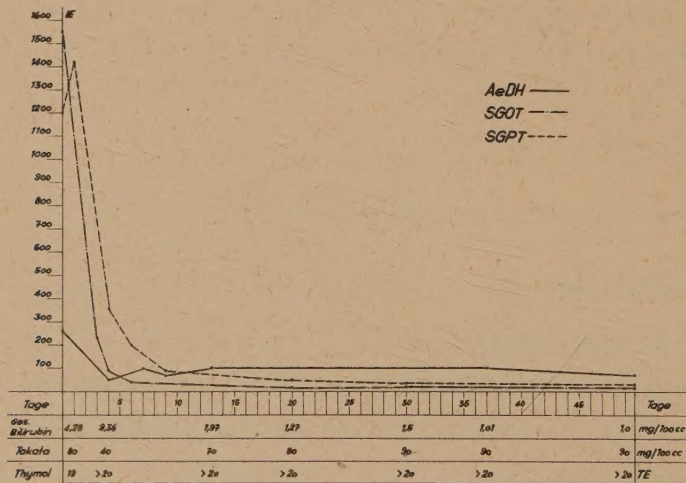


Abb. 2: Verhalten der AeDH bei akuter Hepatitis

Die AeDH-Aktivitätsmessung bietet damit für die Diagnostik der akuten Hepatitis gegenüber den bereits eingeführten Transaminasen (GPT, GOT) keine Vorteile.

Chronische Hepatitis

Auch bei chronischer Hepatitis zeigt sich die AeDH der GPT als nicht überlegen. Bei 8 Fällen war die AeDH 3 mal erhöht, 4 mal lagen die Werte an der oberen Grenze der Normalwerte (siehe Tab. 2).

AeDH	MDH	GPT
54,6	48,6	14,3
59,1	168,0	19,3
63,7	67,0	8,25
45,5	102,0	17,1
145,5	167,5	96,6
86,4	122,0	17,5
100,1	100,5	26,7
59,1		17,2

Tab. 2: Chronische Hepatitis. Aktivität der AeDH.
Vergleich mit den Werten der MDH und der GPT.

Bei Patienten mit Leber-Cirrhose ergaben 8 Messungen folgende Resultate (Tab.3):

AeDH	GPT	
40,9	28,0	
68,2	36,8	
77,3	150,0	Nur im letzten Fall ist die
95,5	34,3	AeDH gegenüber der GPT
63,7	19,3	(fraglich) erhöht.
127,4	96,5	
50,0	22,1	
77,3	13,8	

Wie bereits in der Literatur angegeben, steigen die Fermentwerte nur bei cirrhotischen Schüben an. Auch dann liegen die Werte meist nur wenig über der Normalgrenze. Die kompensierte Cirrhose zeigt häufig normale Werte. Auch hier war die GPT das Enzym, das empfindlicher reagierte als die AeDH.

Für die Differentialdiagnose des Ikterus bietet die AeDH ebenfalls keinen Vorteil.

Stauungsikterus bei Cholelithiasis, Cholecystitis und Cholangitis führte zu folgenden Werten (Tab.4):

AeDH	GPT
81,9	126,0
81,9	13,4
168,9	21,5

Tab.4: Werte bei Stauungsikterus

Herzinfarkt

Wie S i e g e l und B i n g (9) bei Versuchen am Hund festgestellt haben, liegen die Serumwerte der AeDH (wie auch der GOT, Ald und Isomerase) bei Coronarverschluß nach 24 Stunden am höchsten und fallen dann nach 48 Stunden rasch ab.

Wir fanden bei 12 Messungen aus dem Verlauf von mehreren Fällen die AeDH 12 mal erhöht, während die GOT nur 9 mal erhöht war.

Einmal war die Aktivität der GOT mit 23,4 leicht vermehrt, während die der AeDH mit 54,6 völlig normal war (siehe Tab.5).

AeDH	MDH	GOT
104,6	99,5	22,0
136,5	67,0	57,7
100,1	40,5	18,8
91,0	67,0	57,7
200,2	236,0	64,4
77,3	101,0	9,2
95,5	126,0	20,6
318,5	180,0	31,4
227,5	171,0	27,2
63,7	104,0	17,4
81,9	152,0	18,8
136,5	120,0	22,0
109,2	132,0	64,3
54,6	101,0	23,4

Tab. 5: Vergleichende Aktivitätsmessung von AeDH, MDH und GOT bei Herzinfarkt.

Die AeDH erscheint uns nach diesen Ergebnissen für die Früh-
erkennung und Verlaufsbeobachtung des Infarktgeschehens gut
geeignet. Zu diskutieren wäre die Frage, ob in den 3 Fällen,
wo die AeDH im Gegensatz zur GOT erhöht war, nicht eine Leber-
schädigung zur Vermehrung der Dehydrase geführt hat.

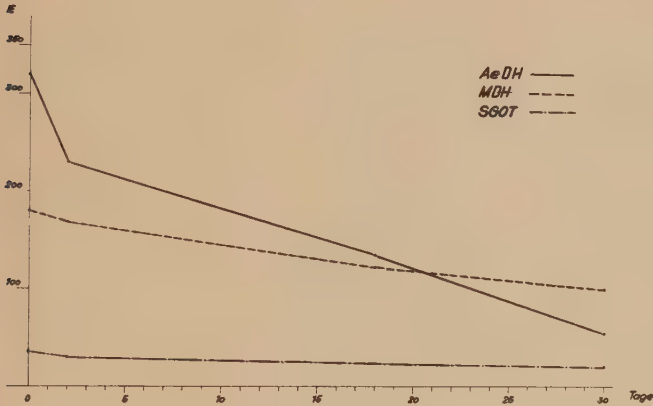


Abb. 3: Verhalten der AeDH in einem Fall von Herzinfarkt.

Ergebnisse bei weiteren Krankheiten (Tab.6):

	AeDH	MDH	GPT
Diabetes mellitus:	100,1	116,2	23,6
	200,2	135,0	54,6
	54,6		21,2
	232,0		
	50,0		
Colitis ulcerosa:	109,2		
	104,6		
	86,4	88,7	9,2

	AeDH	MDH	GPT
Erb'sche Muskeldys-	213,8	168,0	36,8
trophie:	318,5	244,0	54,3
Pankreatitis:	773,0	68,1	96,7
	100,1		23,6
Pyelonephritis:	59,1		16,6
Pleuritis:	91,0	132,0	41,5
Dermatomyositis:	159,2	106,0	72,0
Benzolvergiftung:	100,1		23,5
Melanoblastom:	382,2		
	91,0		
Lymphosarkom:	113,7		
Lymphogranulomatose:	63,7	75,7	
	45,5		
	68,2		
Chron. lymphatische			
Leukämie:	63,7		
Akute lymphatische			
Leukämie:	186,5		
Myeloblastenleukämie:	145,6	402,0	19,8
Polycytämia vera:	273,0	134,4	13,3
Bronchial - Ca:	68,2	205,0	
Kehlkopf - Ca:	68,2	80,4	
Rectum - Ca:	159,2	135,0	
Pankreas - Ca:	118,3	97,4	

Ergebnisse der Untersuchungen

B. der F_1P - Aldolase

Als bemerkenswertes Ergebnis unserer Untersuchungen ist hervorzuheben, daß die Verwendung eines Phosphatpuffers eine wesentlich höhere Aktivität der F_1P -Aldolase beobachten läßt (siehe Abb.4).

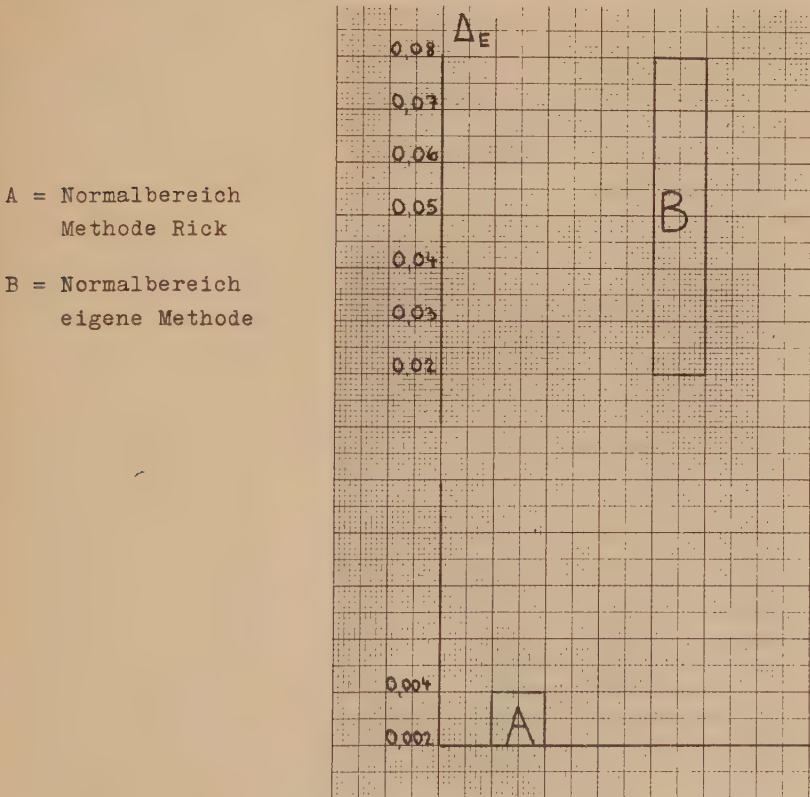


Abb. 4:

Wir untersuchten nach unserer Vorschrift 52 Seren, um einen Überblick über die Brauchbarkeit dieser Methode zu gewinnen. Zunächst versuchten wir an 20 Seren gesunder Personen einen ungefähren Normalbereich festzulegen. Die dabei ermittelten

Werte bewegten sich zwischen 9,1 und 31,8 IE. Eine korrekte Verteilungskurve vermochten wir jedoch mit diesen wenigen Werten nicht aufzustellen (siehe Tab.7). Wir können aber Werte über 40 IE als sicher pathologisch betrachten.

9,1 IE	:	x x x x x	5
13,6 IE	:	x x x	3
18,2 IE	:	x x	2
22,5 IE	:	x x x	3
27,3 IE	:	x x x x	4
31,8 IE	:	x x x	3

Tab. 7: Verteilung der Normalwerte der F_1P - Aldolase.

Erhöhte Werte fanden wir in 9 Fällen von akuter Hepatitis, jedoch war die Aktivitätszunahme nicht so eindeutig, wie bei der gleichzeitig gemessenen GPT. Der höchste Wert betrug 72,8 IE. 2 Fälle von Leber-Cirrhose ergaben normale Werte. 2 Fälle mit Verschlußikterus führten nach längerer Dauer zu erhöhter Aktivität im Serum.

Ergebnisse:(Tab.8)

	F_1P -Aldolase	GPT	MDH
Hepatitis acuta epid.:	36,4	485,0	967,0
	50,0	41,5	117,0
	31,8	269,0	178,0
	72,8	10,1	268,0
	31,8	62,1	89,5
	54,6	64,4	137,0
	31,8	244,0	151,0
	36,4	38,5	168,0
	45,5	464,0	218,0
Leber - Cirrhose:	22,7	14,7	59,5
	31,8	9,65	67,0
	22,5	435,0	268,0

	F ₁ P-Aldolase	GPT	MDH
Verschlußikterus:	40,9 36,4	12,9 52,5	45,3 85,0
Chron. Hepatitis:	36,4	24,7	90,5
Fettleber:	22,7	55,2	32,2
Erb'sche Dystrophie:	59,1	23,9	117,0
Colitis ulcerosa:	22,7	6,44	100,0
Glomerulonephritis:	22,7	48,7	255,0
Chron. Myelose:	22,5 40,9 31,8	86,6 5,25 9,2	35,0 301,0 318,0
Ösophagus - Ca mit Lebermetastasen:	22,7	24,4	117,0
Rectum - Ca mit Lebermetastasen:	18,2	69,0	134,0

Herzinfarkt:

Wir nahmen an 2 Patienten mit Herzinfarkt jeweils 3 mal Fermentuntersuchungen vor und kamen zu folgenden Ergebnissen:

1. Fall

Datum	F ₁ P-Ald.	GPT	GOT	MDH
5.1.	45,5	137,0	51,4	121,0
12.1.	13,6	35,8	19,8	98,0
15.1.	18,2	26,6	15,2	87,0

2. Fall

Datum	F ₁ P-Ald.	GPT	GOT	MDH
11.1.	77,3	21,2	36,8	290,0
12.1.	54,6	11,0	38,7	268,0
16.1.	45,5	19,3	13,3	97,1

Im 1. Fall ist die F_1P -Aldolase am 5.1. mit 45,5 IE erhöht. Die stark vermehrte Aktivität der GPT spricht für eine Leberschädigung, so daß wir die vermehrte F_1P -Aldolase - Aktivität auf eine Leberaffektion zurückführen.

Im 2. Fall jedoch bietet die GPT keinen Anhalt für eine Leberschädigung, so daß wir die erhöhte Aktivität der F_1P -Aldolase auf das Infarktgeschehen zurückführen müssen.

Auch mit unserer neuen Methodik der F_1P -Aldolase-Aktivitätsmessung ergeben sich keine Anzeichen, daß dieses leberspezifische Enzym für die Leberdiagnostik eine größere Krankheitspezifität als die Transaminasen hat.

Zusammenfassung

Es wird über vergleichende Untersuchungen der Aepfelsäuredehydrogenase und der Fruktose-1-Phosphat-Aldolase - Aktivität im Serum bei verschiedenen Erkrankungen, insbesondere bei solchen der Leber berichtet. Trotz der Erhöhung der Empfindlichkeit der Messung der F_1P -Aldolase-Aktivität erwiesen sich beide Fermentaktivitäten weniger krankheitsspezifisch als die gleichzeitige Bestimmung der GPT- und GOT-Aktivität.

L i t e r a t u r :

- 1) Bing,R.J.,
Castellanos,A.,
Siegel, A. Diagnostic value of activity of malic dehydrogease and phosphohexose isomerase, J.Amer.med.Ass. 164 (1957) 647
- 2) Forster,G.
Jenny,E. Der l-Phosphofruktaldolase-Test in der Leberdiagnostik. Acta med./Internisten 63 (1959) 5
- 3) Hess,B.
Raftopoulo,R. Über die Aepfelsäuredehydrogenase im menschlichen Serum, im Liquor cerebrospinalis und anderen Körperflüssigkeiten. Dtsch.Arch.klin.Med. 204 (1957) 97
- 4) Horejssi,J.
Mircivova,L. The determination of activity of phosphofructaldolase in infectious hepatitis. Vnitřní Lek. 5 (1959) 1005
- 5) Jenny, E. Über die Modifikation des l-Phosphofruktaldolase-Tests. Beitrag zur Diagnostik von Leberkrankheiten. Dissert.med.Fakult. Zürich 1958, Juris-Verlag.
- 6) Ordell,R.: Serum malic dehydrogenase-estimation on clinical significance. Abstract., Scand. J.Clin.Lab.Invest.10 Suppl. 31 (1957) 296 (Vortrag Intern.Congress Clin.Chem., Stockholm 1957)
- 7) Rick,W.
Oesterle,H. Über die klinische Bedeutung der Serum-l-Phospho-Fruktaldolase für die Differentialdiagnose und Prognose der Leberkrankheiten. Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 65.Kongreß Wiesbaden, 1959, s. 692, Springer-Verlag.
- 8) Schapira,F. Répartition et activité de la l-phosphofructaldolase. C.R.Seance, Acad.Sci. 247 (1958) 157
- 9) Siegel,A.
Bing,R.P. Plasma enzyme activity in infarction in dog and man. Proc.Soc.exp.Biol., N.Y. 9 (1956) 604
- 10) Wolf,H.P. Die Aktivitätsbestimmung der l-Phosphofructaldolase im Serum als spezifische Reaktion zum Nachweis von Parenchymschädigungen der Leber. Therap.d.Monats Nr.2 (1958) 46
- 11) Wolf,H.P.
Forster,G. u.a. Ein spezifischer optischer Fermenttest zum Nachweis von Parenchymschädigungen der Leber. Helv.Physiol.Acta 15 (1957) C 44
- 12) Wolf,H.P.
Forster,G. u.a. Ein spezifischer optischer Fermenttest zum Nachweis von Parenchymschädigungen der Leber. Gastroenterologia 87 (1957) 172

Lebenslauf

Am 9. Juni 1937 wurde ich, Werner Dietzel, in Nordenham/a.d. Weser als Sohn des Assistenzarztes Dr. Karl Dietzel und seiner Ehefrau Margarete, geb. Raab, als erstes von fünf Kindern geboren.

Von meinem 6. bis 10. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule und anschließend das humanistische "Neue Gymnasium" in Bamberg. Im Jahre 1956 erhielt ich das Reifezeugnis.

Darauf begann ich das Studium der Medizin in Erlangen. Je ein vorklinisches und ein klinisches Semester besuchte ich die Universität München, bzw. Wien. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Anschluß an das Wintersemester 1958/59 in Erlangen ab.

Mit der ärztliche Prüfung, die ich am 11. Juli ebenfalls in Erlangen mit dem Urteil "sehr gut" bestand, beendete ich meine Studienzeit.

W. Dietzel

Erlangen, 13. Juli 1962

GEDRUCKT BEI LUDWIG MÜLLER ERLANGEN